

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 579.22:579.64

DOI: 10.15587/2313-8416.2014.31646

ВПЛИВ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЗДАТНІСТЬ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS* ПРОДУКУВАТИ БІОСУРФАКТАНТИ

©Т. В. Гудзенко, В. О. Іваниця, О. В. Волювач, О. Г. Горшкова, Т. О. Бєляєва,
І. П. Конуп, М. І. Дімова

Підібрано склад поживного середовища, у якому нафтоокиснювальні штами бактерій роду *Pseudomonas* (*P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327) здатні продукувати біосурфактанти. Встановлено час культивування мікроорганізмів для досягнення поліпшених поверхнево-активних властивостей бактеріальних суспензій і їх супернатантів. Експериментально підтверджено, що мікроорганізми продукують переважно біосурфактанти екзогенного типу

Ключові слова: біосурфактанти, нафтоокиснювальні бактерій роду *Pseudomonas*, поживне середовище, оптимальні умови

It is chosen the composition of the nutrient medium in which the oil oxidative strains of bacteria of Pseudomonas genus (P. fluorescens ONU328, P. maltophilia ONU329, P. cepacia ONU327) are able to produce the biosurfactants. The cultivation time of microorganisms to achieve an improved surface-active properties of the bacterial suspensions and their supernatants is set. It is experimentally confirmed that microorganisms produce mainly biosurfactant of exogenous type

Keywords: biosurfactants, oil oxidative bacteria of *Pseudomonas* genus, nutrient medium, optimal conditions

1. Вступ

Способи ліквідації хронічних нафтових забруднень, що ґрунтуються на розкладанні нафтопродуктів мікроорганізмами, визнані одними з найбільш безпечних та ефективних. Бактеріальна деградація лімітується гідрофобною природою вуглеводнів, їх нерозчинністю у воді. Вирішення цієї проблеми можливе у разі продукції нафтоокиснювальними бактеріями біологічних поверхнево-активних речовин (біо-ПАР), тобто біосурфактантів, біоемульгаторів, які не втрачають свої властивості при засоленості ґрунту/води. Біосурфактанти здатні диспергувати нафтопродукти або гідрофобізувати поверхні клітин, що підвищує ефективність контакту бактерій з вуглеводнями і полегшує та водночас прискорює процес окиснення нафтопродуктів.

2. Постановка проблеми

На сьогоднішній день пошук нафтоокиснювальних непатогенних мікроорганізмів, здатних як окремо, так і сумісно у консорціумі продукувати біосурфактанти на спеціально підбраному поживному середовищі, у якому виготовлятиметься поверхнево-активний біопрепарат, є актуальною проблемою екобіотехнології. Тому метою даної роботи було дослідження впливу поживного гідрофільного середовища на здатність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* продукувати біосурфактанти, що є необхідним для їх широкого використання у різних технологічних процесах, зокрема в сучасних біотехнологіях очищення ґрунту з хронічним нафтовим забрудненням.

3. Літературний огляд

Існуює багато наукових робіт, в яких зазначено, що виділення в середовище біоемульгатору є характерним для бактерій роду *Pseudomonas* [1–5]. Гідрофільна клітинна стінка цих бактерій бідна ліпідами і гідрофобні вуглеводні не можуть проникнути через цей бар'єр. Виділяючи у зовнішнє середовище біоемульгатор, ці мікроорганізми знижують гідрофобність вуглеводнів і сприяють їх солюбілізації. Відомо [6], що емульгатор *Pseudomonas* являє собою пептидогліколіпід, до складу якого входять нормальні жирні кислоти, рамноза і амінокислоти. В багатьох роботах розглянуто різні варіації з підборкою компонентів для приготування оптимального поживного середовища або тільки з метою виділення біосурфактантів у чистому вигляді, або з метою приготування на його основі поверхнево-активного біопрепарату, складеного на жаль тільки із монокультури, що володіє нафтоокиснювальною дією по відношенню до вузького спектру нафтових вуглеводнів [2, 4, 5].

4. Вплив складу поживного середовища на здатність нафтоокиснювальних штамів бактерій роду *Pseudomonas* (*P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327) продукувати біосурфактанти

Дослідження проводили з непатогенними штамми бактерій роду *Pseudomonas*, що попередньо були виділені та відібрані, і на сьогоднішній день зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського

національного університету імені І. І. Мечникова: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327. Штами *P. fluorescens* ONU328 та *P. maltophilia* ONU329 виділені з морського середовища, а *P. cepacia* ONU327 – з забрудненого нафтопродуктами ґрунту. Попередні наші лабораторні дослідження показали [7], що перелічені вище штами володіють досить високою нафтоокиснювальною здатністю по відношенню до сирової нафти.

Про здатність колекційних бактерій продукувати біосурфактанти судили по опосередкованим ознакам – по зниженню поверхневого натягу (σ , мДж/м²) і по емульгувальній здатності рідких культур бактерій окремих штамів і їх супернатантів.

Значення поверхневого натягу (σ , мДж/м²) вимірювали методом відриву пластинки з поверхні рідини (метод Вільгельми) з точністю $\pm 0,5$ мДж/м² [8] за температури 25 °С.

Експериментально встановлено, що при тридобовому культивуванні бактерій роду *Pseudomonas* на гідрофільному поживному середовищі за присутністю пептону і дріжджового екстракту – М-9 (I) штами *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 і *P. cepacia* ONU327 не продукували поверхнево-активні речовини (біосурфактанти). Незначну появу поверхнево-активних властивостей рідких культур бактерій (КБ) роду *Pseudomonas* спостерігали лише на п'яту добу. Поверхнево-активні властивості КБ

роду *Pseudomonas* оцінювали за значенням поверхневого натягу (σ , мДж/м²) відносно стандарту – дистильованої води з довідковим значенням $\sigma(H_2O)^{25}=72,0$ мДж/м² [9], і контролю (в даному випадку) – стерильного поживного середовища М-9 (I) з рН=7,0 \pm 0,2 складу (г/л): КН₂РО₄ – 1,5; Na₂НРО₄ – 3,0; NaCl – 5,0; NH₄Cl – 1,0; глюкоза – 2,0; пептон – 10,0; дріжджовий екстракт – 5,0, за відсутністю мікроорганізмів.

Показано (табл. 1), що за присутністю в поживному середовищі М-9 (I) (контроль) значної кількості білкової речовини – 1 % пептону і 0,5 % дріжджового екстракту поверхневий натяг контрольного розчину відносно дистильованої води помітно знижувався з 72,0 до 51,2 мДж/м² при знайденій константі води – 0,2028. Відносно контролю значення поверхневого натягу (σ_x^*) досліджуваних бактеріальних культур помірно зменшувалось з 51,2 до 43,0-44,8 мДж/м² (в залежності від обраного штаму бактерій) за умови 30 хв витримання проб. Рівноважні значення поверхневого натягу, представлені у таблиці як σ_x , усіх досліджуваних бактеріальних культур встановлювалось протягом 120 хв, після чого значення σ в межах похибки експерименту не змінювалось. Через 120 хв по відношенню до контролю значення σ_x для *P. fluorescens* ONU328 зменшувалось лише на 9,8 мДж/м², для *P. cepacia* ONU327 – на 8,8 мДж/м² і для *P. maltophilia* ONU329 – на 7,7 мДж/м² (табл. 1).

Таблиця 1

Поверхнево-активні властивості рідких культур бактерій (КБ) роду *Pseudomonas* та їх супернатантів (С)

Штам	<i>P. fluorescens</i> ONU328		<i>P. maltophilia</i> ONU329		<i>P. cepacia</i> ONU327		Контроль М-9 (I)
	КБ	С	КБ	С	КБ	С	
при рості бактерій на поживному середовищі М-9 (I) з пептоном і дріжджовим екстрактом							
σ_x^* , мДж/м ²	43,0	49,9	43,3	50,1	44,8	49,4	51,2
σ_x , мДж/м ²	41,4	47,5	43,5	50,0	42,4	47,2	51,2
$\sigma(M-9(I)) - \sigma_x$, мДж/м ²	9,8	3,7	7,7	1,2	8,8	4,0	0,0
$\sigma(H_2O) - \sigma_x$, мДж/м ²	30,6	24,5	28,5	22,0	29,6	24,8	20,8
Штам	<i>P. fluorescens</i> ONU328		<i>P. maltophilia</i> ONU329		<i>P. cepacia</i> ONU327		Контроль М-9 (II)
	КБ	С	КБ	С	КБ	С	
при рості бактерій на поживному середовищі М-9 (II) за відсутністю пептону та дріжджового екстракту							
σ_x^* , мДж/м ²	48,9	51,4	49,1	53,13	56,7	60,5	67,9
σ_x , мДж/м ²	46,8	49,8	47,9	48,9	54,9	58,7	67,9
$\sigma(M-9(II)) - \sigma_x$, мДж/м ²	21,1	18,1	20,0	19,0	13,0	9,2	0,0
$\sigma(H_2O) - \sigma_x$, мДж/м ²	25,2	22,2	24,1	23,1	17,1	13,3	4,1

Примітка: оптимальний час культивування бактерій – 5 діб при температурі 28 °С; $K(H_2O)=0,2028$

З метою визначення типу біосурфактантів (біологічних поверхнево-активних речовин біо-ПАР) – позаклітинні або клітинно-зв'язані, бактеріальні клітини відділяли центрифугуванням (6500 обор/хв. протягом 20 хв) та вимірювали поверхневий натяг одержаних супернатантів. Аналіз одержаних даних дозволив стверджувати про помірну здатність штаму *P. maltophilia* ONU329 продукувати на середовищі М-9 з пептоном і дріжджовим екстрактом лише

біосурфактанти ендogenousного типу. Про відсутність біосурфактантів екзогенного типу свідчила наближеність значення поверхневого натягу супернатанту, одержаного із культури бактерій штаму *P. maltophilia* ONU329, до значення $\sigma(M-9(I))$. Штами *P. fluorescens* ONU328 і *P. cepacia* ONU327 продукували незначну долю як клітинно-зв'язаних біосурфактантів, так і незначну долю позаклітинних біосурфактантів. Поверхневий натяг супернатантів,

що містили позаклітинні біо-ПАР, зменшувався лише на 4,0 мДж/м² від загального зменшення поверхневого натягу відповідних бактеріальних культур приблизно на 10 мДж/м². По здатності на середовищі М-9 (I) (з пептоном і дріжджовим екстрактом) продукувати біо-ПАР штами бактерій роду *Pseudomonas* розташовуються в такій послідовності: *P. fluorescens* ONU328>*P. cepacia* ONU327>*P. maltophilia* ONU329.

Подальші тензіометричні дослідження поверхнево-активних властивостей рідких культур штамів бактерій роду *Pseudomonas* при рості на поживному середовищі за відсутності пептону і дріжджового екстракту – М-9 (II), підтвердили суттєву залежність здатності мікроорганізмів продукувати біосурфактанти в залежності від складу поживного середовища. На більш збідненому поживному середовищі із σ (М-9 (II))=67,9 мДж/м² поверхнево-активні властивості культур досліджуваних бактерій відносно контролю М-9 (II) виявлялись в значно більшому ступені, особливо на п'ятий день культивування бактерій при 28 °С. Рівноважне значення поверхневого натягу (σ_x) через 120 хв зменшувалось з 67,9 мДж/м² до 46,8 мДж/м² при використанні штаму *P. fluorescens* ONU328, до 47,9 мДж/м² – при використанні штаму *P. maltophilia* ONU329 і до 54,9 мДж/м² – при використанні штаму *P. cepacia* ONU327. Таке зниження σ_x обумовлено появою малої доли клітинно-зв'язаних і переважною більшістю позаклітинних біосурфактантів. На користь цього ствердження свідчить наявність поверхнево-активних властивостей супернатантів, одержаних центрифугуванням досліджуваних бактеріальних культур (6500 обор/хв. протягом 20 хв). Рівноважні значення поверхневого натягу супернатантів зменшувались з 67,9 мДж/м² до 49,8 мДж/м² при відділенні бактеріальних клітин штаму *P. fluorescens* ONU328, до 48,9 мДж/м² – при відділенні бактеріальних клітин штаму *P. maltophilia* ONU329 і до 58,7 мДж/м² – при відділенні бактеріальних клітин штаму *P. cepacia* ONU327.

На рис. 1 представлені результати по здатності колекційних культур бактерій-деструкторів нафти [7] продукувати біосурфактанти (у %), що була розрахована через значенням поверхневого натягу досліджуваних бактеріальних суспензій і відповідного поживного середовища при фіксованому значенні сталої води.

Із представлених даних видно (рис. 1): на поживному середовищі М-9 (II) за відсутності біостимуляторів, тобто за відсутності у поживному середовищі азоту, спостерігалось збільшення здатності продукувати біо-ПАР майже в 2 рази у штамів *P. fluorescens* (від 19 % до 31 %) і *P. maltophilia* (від 15 % до 30 %). Штам *P. cepacia* майже в рівному ступені продукував біо-ПАР на середовищі М-9 (I) і М-9 (II) відповідно 17,2 % і 19,2 %. Аналогічні дані по здатності продукувати біо-ПАР на спеціально підбраному поживному середовищі з невеликою кількістю азоту та мікроелементів за присутності глюкози було

спостережено авторами у штаму *P. aeruginosa* DSM2659 [10].

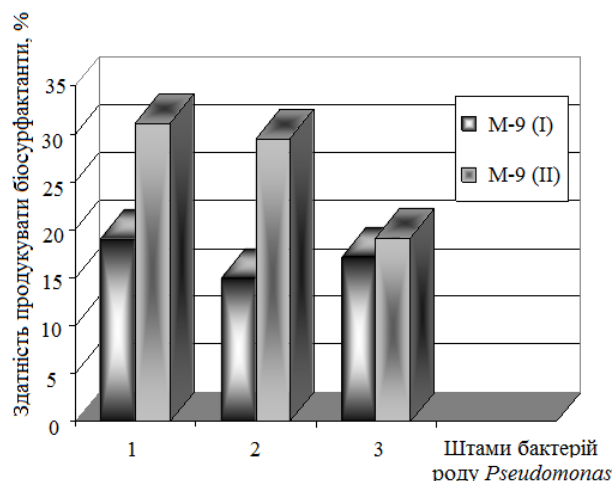


Рис. 1. Здатність штамів бактерій роду *Pseudomonas* *P. fluorescens* ONU328 (1), *P. maltophilia* ONU329 (2), *P. cepacia* ONU327 (3) продукувати біосурфактанти у поживному середовищі М-9 (I) і М-9 (II)

Вперше експериментально встановлено, що бактеріальні суспензії, складені із досліджуваних штамів бактерій роду *Pseudomonas* володіють достатньо високою (більше 40 %) емульгувальною здатністю по відношенню до соняшникової олії.

5. Апробація результатів досліджень

Результати досліджень пройшли успішну апробацію при біотехнологічному очищенні протягом 2013–2014 рр. нафтозабруднених ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням. Біопре-парат на основі синергетично діючої комбінації трьох досліджуваних колекційних культур бактерій *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 (у об'ємних співвідношеннях 1:1:1), що був внесений у нафтозабруднений ґрунт у іммобілізованому на змішаних природних носіях (торф, хітозан, тирса), показав за екстремальних умов навколишнього середовища (наявність іонів важких металів, мінеральних солей) високу деструктивну здатність (на 80–90 %) по відношенню до нафтових вуглеводнів і смолисто-асфальтенових речовин при очищенні замазучених ділянок ґрунту о. Зміїний.

6. Висновки

Тензіометричним методом підтверджено, що протягом п'яти діб культивування колекційних культур бактерій роду *Pseudomonas* (*P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327) у поживному середовищі М-9 (II) за відсутності пептону і дріжджового екстракту бактерії в значно більшому ступені продукують біосурфактанти, ніж у середовищі М-9 (I) за присутності пептону і дріжджового екстракту, при температурі 28 °С і значенні рН≈7. При цьому на М-9 (II) мікроорганізми в основному продукують змішані біосурфактанти з переважною долею біосурфактантів екзогенного

типу, про що свідчать наявні поверхнево-активні властивості їх супернатантів. Виявлене дозволяє рекомендувати використовувати досліджувані три непатогенних штами *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. sepiacia* ONU327 в якості синергетично діючого поліфункціонального бактеріального консорціуму у складі нового біопрепарату, призначеного для екологічно безпечного, більш швидкого та ефективного в порівнянні з [2, 5] біотехнологічного очищення ґрунту від широкого спектру нафтових забруднень, в тому числі смолисто-асфальтенових речовин.

Література

1. Корнелли, Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде [Текст] / Т. В. Корнелли // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 579–585.
2. Патент України на винахід № 71792А. Поверхнево-активний біопрепарат [Текст] / Карпенко О. В., Мартинюк Н. Б., Шульга О. М., Покиньюра Т. Я., Вільданова-Марцишин Р. І., Щеглова Н. С. – Опубл.: 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004.
3. Сопрунов, О. Б. Штаммы-деструкторы нефтяных углеводов [Текст] / О. Б. Сопрунов, М. А. Ключанов // Вестник АГТУ. – 2007. – Вып. 1. – С. 180–183.
4. Kumar, M. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. [Text] / M. Kumar, V. León, A. Materano, De Sisto, O. A. Ilzins, L. Luis // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 24, Issue 7. – P. 1047–1057. doi: [10.1007/s11274-007-9574-5](https://doi.org/10.1007/s11274-007-9574-5)
5. Obayori, O. S. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1 [Text] / O. S. Obayori, M. O. Ilori, S. A. Adebuseye, G. O. Oyetibo., A. E. Omotayo, O. O. Amund // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 25, Issue 9. – P. 1615–1623. doi: [10.1007/s11274-009-0053-z](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0053-z)
6. Гоголева, О. А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем [Текст] / О. А. Гоголева, Н. В. Немцева // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2012. – № 2. – С. 1–7.
7. Гудзенко, Т. В. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* [Текст] / Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач, Т. О. Беляєва, І. В. Пузирьова, Г. В. Лісютін, О. Г. Горшкова, В. О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 72–80.

8. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии [Текст] / Под ред. С. С. Воюцкого. – М., 1974. – С. 68–72.

9. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии [Текст] / Под ред. Ю. Г. Фролова, А. С. Гродского. – М: Химия, 1986. – 216 с.

10. Кузьменко, А. В. Биосинтез поверхнево-активних речовин представниками роду *Pseudomonas* [Текст] / А. В. Кузьменко // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 1.

References

1. Cornelli, T. V. (1996). Principles and methods of intensification of the biological destruction of hydrocarbons in the environment. Applied biochemistry and Microbiology, 32 (6), 579–585.
2. Karpenko, O. C., Martynuk, N. B., Shulga, O. M., Parinibbana, S. Y., Vildanova-Marcelin, I., Shcheglova, N. (2004). Patent of Ukraine for an invention № 71792A. Surface-active biologic. With. Publ.: 15.12.2004, bull. No. 12, 2004.
3. Soprunov, O. B., Klyanov, M. A. (2007). Strains destructors petroleum hydrocarbons. Bulletin of ASTU, 1, 180–183.
4. Kumar, M., León, V., Materano, A., Sisto, De, Ilzins, O. A., Luis, L. (2008). Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24 (7), 1047–1057. doi: [10.1007/s11274-007-9574-5](https://doi.org/10.1007/s11274-007-9574-5)
5. Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebuseye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., Amund, O. O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25 (9), 1615–1623. doi: [10.1007/s11274-009-0053-z](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0053-z)
6. Gogolev, O. A., Nemtseva, N. V. (2012). Hydrocarbon-oxidizing microorganisms in natural ecosystems. Bulletin of the Orenburg scientific center, Ural branch of the Russian Academy of science (e-journal), 2, 1–7.
7. Gudzenko, T. V., Voliuvach, O. V., Beliaeva, T. O., Konup, I. P., Bukhtiarov, A. E., Lisiutin, G. V., Puzyreva, I. V., Gorshkova, O. G., Ivanytsia, V. O. (2013). Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. Microbiology and biotechnology, 4, 72–80.
8. Voski, S. C. Workshop on colloidal chemistry and electron microscopy (1974). Moscow., USSR: Chemistry, 300.
9. Frolov, Yu, Grodsky, A. S. (1986). Laboratory work and tasks on colloid chemistry. Moscow., USSR: Chemistry, 216.
10. Kuzmenko, A. V. (2013). Biosynthesis of surfactants representatives of the genus *Pseudomonas*. Problems of environmental biotechnology, 1.

Дата надходження рукопису 20.11.2014

Гудзенко Тетяна Василівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник Біотехнологічного науково-навчального центру, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

E-mail: 7872930@mail.ru

Іваниця Володимир Олексійович, доктор біологічних наук, професор, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

E-mail: y_ivanit@ukr.net

Волювач Ольга Вячеславівна, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник Біотехнологічного науково-навчального центру, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

E-mail: voluvach@ukr.net

Горшкова Олена Георгіївна, молодший науковий співробітник (аспірант) Біотехнологічного науково-навчального центру, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

E-mail: elena-good@bk.ru

Беляєва Тамара Олексіївна, науковий співробітник Біотехнологічного науково-навчального центру, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

Конуп Ігор Петрович, науковий співробітник Біотехнологічного науково-навчального центру, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

Дімова Марія Іванівна, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології, Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, Україна, 65082

E-mail: dimova.92@mail.ru

УДК 633.111:57.085.2(043.3)

DOI: 10.15587/2313-8416.2014.31733

ДОСЛІДЖЕННЯ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ СОРТІВ ТА РЕЦИПРОКНИХ ГІБРИДІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

© **І. С. Замбрборщ, О. Л. Шестопап**

Провели тестування гаплопродукційної здатності в культурі in vitro пиляків м'якої озимої пшениці. У гібридів F₁ виявлено різний характер наслідування показників «формування новоутворень» та «регенерації зелених рослин»: ефекти гетерозису та депресії, проміжний характер наслідування або прояв ознак на рівні одного з батьків. В культурі пиляків озимої пшениці отримано 283 зелених рослин-регенеранта

Ключові слова: м'яка пшениця, культура пиляків *in vitro*, подвійні гаплоїди, регенерація

Testing of haploproduction ability in vitro anther culture of bread winter wheat was studied. The different nature of indicator inheritance of "forming of tumors" and "regeneration of green plants" for F₁ hybrids were detected: effects of heterosis and depression, intermediate nature, and the inheritance of signs at the level of the parents. The 283 green plant-regenerants were obtained by anther culture of winter wheat

Keywords: bread wheat, anther culture in vitro, double haploids, regeneration

1. Вступ

Сьогодні широкий розвиток і практичне використання стосовно різних сільськогосподарських культур здобули біотехнології на рівні гаплоїдних клітин. Для злаків, зокрема для пшениці, для отримання дигаплоїдних рослин широко застосовується біотехнологія, заснована на явищі андрогенезу у системі культивування пиляків *in vitro* [1–4]. Ідея розробки цієї технології полягає у збагаченні сучасної селекції рослин допоміжними методами одержання гомозиготних ліній з гібридних популяцій з метою прискореного створення лінійних, достатньо продуктивних й високо адаптивних сортів економічно цінних злаків [5].

2. Постановка проблеми

Для ефективного отримання лінійного матеріалу озимої пшениці з подальшим залученням останнього у селекційні програми актуальною є проблема виявлення найбільш чутливих до андрогенезу *in vitro* форм серед наданих селекціонером. Тому мета даного дослідження полягала у тестуванні гаплопродукційної здатності 4 батьківські сортів та отриманих на їхній основі 12 популяцій реципрокних гібридів F₁ пшениці м'якої озимої.

3. Літературний огляд

Про явище «андрогенезу *in vitro*» у м'якої пшениці вперше за результатами трьох незалежних досліджень у 1973 році повідомили Ouyang L. W., Picard E., J. De Buyser та Wang C. C. Перші рослини подвоєних гаплоїдів у культурі пиляків пшениці було отримано на початку 70-х років. Поступово метод удосконалювався, підвищувалась його ефективність. У роботах різних авторів були розроблені й підібрані живильні середовища для культивування пиляків і визначено чинники, що впливають на проявлення здатності до андрогенезу рослин у культурі *in vitro* [6]. Це дозволило одержувати нові сорти пшениці з подвоєних гаплоїдів.

Проте, у теперішній час, за потенційно високої ефективності цієї біотехнологічної системи андрогенезу *in vitro*, у порівнянні з традиційними методами селекції, які використовуються для одержання лінійного матеріалу пшениці, результативність методу культури пиляків поки що недостатня. Висока генотипоспецифічність м'якої пшениці за чутливістю до андрогенезу *in vitro* обумовлює низький вихід подвоєних гаплоїдів, особливо, у роботі з озимими формами [1, 3, 4]. Виходячи з цього, вдосконалення окремих етапів цієї перспективної біотехнології, що ведуть до регенерації